

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1932

THÈSE

N° 301

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Pierre DELBOVE

Né le 19 mai 1903, à Valenciennes

LE BACILLUS BIFIDUS

(H. TISSIER 1899)

SON ANTAGONISME BACTÉRIEN

Président : M. LEMIERRE, professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1932

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1932

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(DIPLOME D'ÉTAT)

PAR

Pierre DELBOVE

Né le 19 mai 1903, à Valenciennes

LE BACILLUS BIFIDUS

(H. TISSIER 1899)

SON ANTAGONISME BACTÉRIEN

Président : M. LEMIERRE, professeur

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

JOUBE & C^{ie}, ÉDITEURS

15, RUE RACINE, 15

1932

DOYEN... M. BALTHAZARD

I. — PROFESSEURS

MM.

Anatomie	ROUVIÈRE.
Anatomie médico-chirurgicale et chirurgie expérimentale.....	GRÉGOIRE.
Physiologie	BINET.
Physique médicale.....	STROHL.
Chimie médicale.....	DESGREZ.
Bactériologie	LEMIERRE.
Parasitologie et histoire naturelle médicale.....	BRUMPT.
Pathologie et thérapeutique générales.....	BAUDOUIN.
Pathologie médicale.....	CLERC.
Pathologie chirurgicale.....	LENORMANT.
Anatomie pathologique.....	ROUSSY.
Histologie	CHAMPY.
Pharmacologie et matière médicale.....	TIFFENEAU.
Thérapeutique	LOEPER.
Hygiène et médecine préventive.....	TANON.
Médecine légale	BALTHAZARD.
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	MÉNÉTRIÉR.
Pathologie expérimentale et comparée.....	RATHERY.
Hydrologie thérapeutique et climatologie.....	Maurice VILLARET.
Clinique médicale.....	CARNOT.
	BEZANÇON.
	ACHARD.
	Marcel LABBÉ.
Hygiène et clinique de la première enfance.....	LEREBoullet.
Clinique des maladies des enfants.....	NOBÉCOURT.
Clinique des maladies mentales et des maladies de l'encéphale...	H. CLAUDE.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....	GOUGEROT.
Clinique des maladies du système nerveux.....	GUILLAIN.
Clinique des maladies infectieuses.....	TEISSIER.
	DEL BET.
Clinique chirurgicale.....	CUNÉO.
	LEJARS.
	GOSSET.
Clinique ophtalmologique.....	TERRIEN.
Clinique urologique.....	LEGUEU.
	COUVELAIRE.
Clinique d'accouchements.....	BRINDEAU.
	JEANNIN.
Clinique gynécologique.....	J.-L. FAURE.
Clinique chirurgicale infantile et orthopédie.....	OMBRÉDANNE.
Clinique thérapeutique médicale.....	VAQUEZ.
Clinique oto-rhino-laryngologique.....	SEBILEAU.
Clinique thérapeutique chirurgicale.....	Pierre DUVAL.
Clinique propédeutique.....	SERGENT.
Clinique de la tuberculose.....	Léon BERNARD.
Professeurs sans chaire.....	MAUCLAIRE.
	MULON.



II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM.

ALAJOUANINE.. Neurologie et Psychiatrie.
 N. Physiologie.
 AUBERTIN Pathologie médicale.
 BÉNARD (H.)... Pathologie médicale.
 BROCCQ Pathologie chirurgicale.
 BRULÉ Pathologie médicale.
 CADENAT Pathologie chirurgicale.
 CATHALA Pathologie médicale.
 CHABROL Pathologie médicale.
 CHEVALLIER.. Pathologie médicale.
 DE GAUDART D'ALLAINES. Pathologie
 chirurgicale.
 DOGNON Physique.
 DONZELOT Pathologie médicale.
 ÉCALLE Obstétrique.
 FEY Urologie.
 GARNIER Pathologie expérimentale.
 GASTINEL Bactériologie.
 GATELLIER ... Pathologie chirurgicale.
 GIROUD Histologie.
 HARVIER Pathologie médicale.
 HAZARD Pharmacologie.
 HOVELACQUE . Anatomie.
 HUGUENIN Anatomie pathologique.
 HUTINEL Pathologie médicale.
 JOANNON Hygiène.

MM.

LABBÉ (Henri) . Chimie biologique.
 LAROCHE (G.).. Pathologie médicale.
 LEMAITRE Oto-rhino-laryngologie.
 LEVEUF Pathologie chirurgicale.
 LÉVY-VALENSI. Neuro-psychiatrie.
 LIAN Pathologie médicale.
 MILLOT Histologie.
 MONDOR Pathologie chirurgicale.
 MOREAU Pathologie médicale.
 MOULONGUET . Pathologie chirurgicale.
 MOURE Pathologie chirurgicale.
 OBERLING Anatomie pathologique.
 OLIVIER Anatomie.
 PIÉDELIEVRE . Médecine légale.
 PORTES Obstétrique.
 QUÉNU Pathologie chirurgicale.
 RICHTER Physiologie.
 SANNIÉ Chimie biologique.
 SÉZARY Dermatologie et Syphili-
 graphie.
 VALLERY-RADOT (Pasteur). Pathologie
 médicale.
 VAUDESCAL .. Obstétrique.
 VELTER Ophtalmologie.
 VERNE Histologie.
 VIGNES Obstétrique.

III. — AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE

POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.

BUSQUET Pharmacologie.
 GUÉNIOT Obstétrique.
 LEQUEUX Obstétrique.
 LEROUX Anatomie pathologique.

MM.

NEVEU-LEMAIRE. Parasitologie.
 RETTERER Histologie.
 ZIMMERN Physique.

IV. — AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

A TITRE PERMANENT

MM.

ABRAMI Clinique médicale.
 CHIRAY Clinique médicale.
 DEBRÉ Clinique médicale.
 DUVOIR Clinique médicale.
 FIESSINGER .. Clinique médicale.
 LAIGNEL-LEVASTINE. Clinique médicale.
 BASSET Clinique chirurgicale.
 CHEVASSU Clinique chirurgicale.

MM.

HEITZ-BOYER Clinique chirurgicale.
 MATHIEU Clinique chirurgicale.
 MOCQUOT Clinique chirurgicale.
 PROUST Clinique chirurgicale.
 SCHWARTZ ... Clinique chirurgicale.
 LE LORIER Clinique chirurgicale.
 LÉVY-SOLAL .. Clinique obstétricale.
 METZGER Clinique obstétricale.

V. — CHARGÉS DE COURS

MM. MAUCLAIRE, professeur sans chaire	{	Chargé du cours de chirurgie orthopédique chez l'adulte pour les accidentés du travail, les muti- lés de guerre et les infirmes adultes.
FREY		Stomatologie.
CHAILLEY-BERT		Éducation physique.
LEDoux-LEBARD		Radiologie clinique.
WEIL-HALLÉ.....		Puériculture.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE
DE MON GRAND-PÈRE, DE MON PARRAIN

A MES PARENTS

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LEMIERRE

Professeur de Bactériologie à la Faculté

*En le remerciant du grand hon-
neur qu'il nous fait, en acceptant la
présidence de cette thèse.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR ROUX

Directeur de l'Institut Pasteur

*Hommage de respect et d'admira-
tion.*

A MON MAÎTRE

MONSIEUR R. LEGROUX

Chef de Service à l'Institut Pasteur

*Qui a bien voulu m'accueillir dans
son laboratoire et me guider dans
mon travail.*

*En témoignage de reconnaissance
et de respectueux attachement.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR V. GRYZEZ

Chefs de Laboratoire à l'Institut Pasteur de Lille

*Qui m'a témoigné tant de bienveil-
lance durant mon séjour dans son
laboratoire.*

*Hommage de profond respect et
de reconnaissance.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR P. AMEUILLE

Médecin de l'Hôpital Cochin

*Dont l'influence fut si grande au
cours de mes études médicales.*

*Hommage de respectueux dévoue-
ment.*

A NOS MAÎTRES DANS LES LABORATOIRES

MM. LES DOCTEURS J. DUMAS ET P. GIROUD

Chefs de Laboratoire à l'Institut Pasteur

A MES MAÎTRES DANS LES HÔPITAUX

1923-1929

1923-1924. M. le Professeur GOSSET

M. le Professeur CHAUFFARD

M. le Professeur agrégé C. LIAN

1925. M. le Professeur agrégé THIÉRY

1926. M. le Docteur P. AMEUILLE

1927. M. le Docteur R. TOUPET

M. le Docteur R. MARQUÉZY

1928-1929. M. le Docteur H. LEMAIRE (*in memoriam*)

1929. M. le Docteur J. CHIRIÉ

M. le Docteur J. RAVINA

A Monsieur le Médecin Capitaine FAYOT

A MES AMIS DANS LES LABORATOIRES

Mme le Docteur TUAL-JÉRAMEC, M. le Docteur J. BRUNEAU, Institut Pasteur. Paris.

MM. les Docteurs SEVIN et BUTTIAUX, Institut Pasteur. Lille.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

LE BACILLUS BIFIDUS

(H. TISSIER 1899)

SON ANTAGONISME BACTÉRIEN

Introduction.

Le *Bacillus Bifidus* fut décrit et étudié pour la première fois par Henry Tissier, en 1899, dans une communication à la Société de Biologie. En 1900, il en fit le sujet de sa thèse de doctorat, et le donna comme espèce prédominante de la flore normale du nourrisson au sein.

Escherich, en 1885-1886, étudiant la flore intestinale des nouveau-nés bien portants, soumis à l'allaitement maternel, note à l'examen microscopique des selles, que toutes les bactéries semblent identiques entre elles et paraissent en quelque sorte provenir d'une « culture pure » d'une seule espèce.

Il s'agit, dit-il, de bacilles grêles, isolés ou par paires, présentant souvent de nombreuses variétés dans leur forme et dans leur grosseur.

A côté de cette forme prédominante, il note inconstamment une autre espèce, à éléments beaucoup plus courts et plus arrondis, en nombre va-

riable, « souvent si petits qu'on ne peut les trouver qu'après de patientes recherches ; dans les conditions normales, leur nombre est bien inférieur à celui de la forme précédente ».

Ces deux espèces constantes il les appelle les « Obligates Bactériens ».

Ensemencant les selles sur plaques de gélatine, il isole toujours du *Bacterium coli* et du *Bacterium lactis aerogenes*. D'où il conclut que ces bactéries sont bien celles qu'il trouve aux examens microscopiques.

Plus tard, en colorant ses préparations de selles normales par la méthode de Gram-Fuschsine alcoolique (comme colorant de contraste), il voit des bactéries colorées en bleu, d'autres en rouge, d'autres moitié bleu, moitié rouge.

Les préparations de selles d'enfants atteints de troubles intestinaux lui ont par contre toujours montré une prédominance des microbes colorés en rouge.

Comme dans la majorité des cas, ses cultures ne lui donnent que du *Bacterium coli*, il en déduit que ces deux espèces, bleue et rouge, appartiennent à la même variété microbienne.

Et il se demande s'il n'y a pas dans l'intestin normal de l'enfant au sein des conditions permettant au *Bacterium coli* de garder la coloration de Gram, conditions disparaissant chez l'enfant malade.

Ces travaux sont confirmés par Babinsky en 1888.

Schmidt (1892) pense que ces différences de coloration tiennent à la nature de l'alimentation.

Grâce à la richesse particulière en graisses du milieu nutritif, le *Bacterium coli* acquerrait la propriété de garder le Gram. Notion demeurée — d'ailleurs à tort — longtemps classique.

C'est alors que Tissier, étudiant les rapports qui existent entre le *Bacterium coli* et la réaction chromophile d'Escherich, montre qu'en aucun cas le *bacterium coli* ne peut garder la coloration de Gram et que le bacille qui, dans les selles normales du nourrisson au sein, avait cette propriété, était, non une variété de *Bacterium coli*, mais bien une espèce différente, anaérobie stricte, qu'il propose d'appeler *Bacillus bifidus*.

L'erreur d'Escherich et de ses élèves provenait de ce que ces auteurs avaient pratiqué leurs ensemencements uniquement en aérobiose et n'avaient pu ainsi obtenir que des bacilles du côlon.

Depuis, de nombreuses publications, tant en France qu'à l'étranger ont paru sur la flore intestinale du nourrisson, confirmant le travail de Tissier.

Nous nous proposons d'étudier le *bacillus bifidus* :

Ses caractères cultureux.

Son antagonisme vis-à-vis de certaines autres bactéries intestinales et en particulier le bacille du côlon.

CHAPITRE PREMIER

Morphologie. Méthodes d'isolement. Caractères des cultures.

Morphologie.

Le bacillus bifidus est un germe anaérobie strict, ayant le plus souvent la forme d'un bâtonnet, gardant la coloration de Gram. Ne présentant pas de spores.

Ce qui frappe surtout à l'examen microscopique des frottis de selles ou de préparations de cultures pures de ce genre, c'est son extrême polymorphisme. En effet, s'il affecte fréquemment la forme d'un bacille mince, long de 2 à 3 μ en moyenne, il peut prendre un aspect effilé ; parfois les éléments sont groupés en paquets ou disposés parallèlement côte à côte ; d'autres fois les bâtonnets sont incurvés, à extrémités arrondies, certains paraissent ramifiés. Dans les vieilles cultures, il n'est pas rare de trouver ces formes que Tissier a appelées « en raquette » formées d'un court bâtonnet se prolongeant par un renflement clair non coloré, sorte de vésicule. Enfin le bacille tout entier peut être trans-

formé en une seule vésicule allongée qui ne se colore qu'à ces deux pôles.

Nous verrons dans un chapitre ultérieur comment on peut interpréter ces différents aspects morphologiques.

Conditions de culture.

Anaérobie strict, le bacillus bifidus ne cultive bien qu'à la température de 32°-37°. A 20° les cultures sont plus lentes et plus maigres.

Il ne pousse que très lentement, et ce n'est en général que 48 heures après l'ensemencement que l'on assiste à un départ des cultures qui ne sont réellement florissantes qu'après 4 à 5 jours.

Il est indispensable d'ajouter aux milieux de culture des hydrates de carbone. Classiquement le lactose et le maltose seraient les plus favorisants, mais nous verrons qu'on obtient de très belles cultures en milieux glucosés.

Méthodes d'isolement.

Beaucoup de procédés ont été indiqués pour isoler le bacillus bifidus en partant des selles de nourrissons.

Le prélèvement des matières fécales doit toujours être fait de façon aussi rigoureusement aseptique que possible. On peut les recueillir dans des couches stériles, mais on emploiera de préférence

les sondes rectales. Il paraît pratique d'utiliser les sondes en gomme molle, type sonde uréthrale d'assez gros calibre, qu'on introduit dans le rectum de l'enfant. On aspire légèrement au moyen d'une seringue abouchée à la sonde, les matières se collectent dans celle-ci et sont ensuite projetées dans un tube à essai stérile.

On peut également pratiquer les prélèvements dans l'ampoule rectale au moyen d'une petite cuiller de verre, facile à fabriquer au laboratoire.

Un tube de verre pour pipette Pasteur est scellé à une extrémité. Après refroidissement, une des faces de cette extrémité est portée tangentiellement contre la flamme du chalumeau. Lorsque le verre est chauffé au rouge, une simple aspiration pratiquée à l'autre extrémité de la pipette produit une dépression en cupule au niveau de la partie chauffée, cupule à bords mousses, solide, qui pénétrera facilement jusqu'à l'ampoule rectale.

Ces cuillers sont stérilisées à l'autoclave à 115° en tubes bouchés.

Les matières ainsi recueillies sont examinées au microscope, à l'état frais et après double coloration par la méthode de Gram-Fuchsine.

Examens qui renseignent sur :

L'abondance plus ou moins grande des germes ;

Leur mobilité ;

Et surtout peut donner une idée relative du

rapport numérique qui existe entre les espèces gardant la coloration de Gram et celles qui ne la gardent pas.

Ces notions sont indispensables pour fixer :

Les difficultés de l'isolement ;

Le choix de la technique ;

La quantité de semence à employer pour obtenir des colonies isolées.

Il sera très souvent nécessaire de diluer les matières fécales dans une quantité plus ou moins grande de bouillon nutritif ou d'eau physiologique avant de pratiquer les ensemencements.

Tissier pratiquait ses isolements en gélose glucosée profonde de Veillon, de la façon suivante :

10 à 12 tubes de gélose Veillon sont chauffés au bain-marie jusqu'à fusion du milieu. La température de la gélose est alors d'environ 80°. On la laisse refroidir jusqu'à 55°, c'est-à-dire pratiquement jusqu'à ce que l'on puisse tenir facilement les tubes à la main. On fait alors les ensemencements.

Pour cela on prélève au moyen d'une pipette Pasteur stérile, une certaine quantité de matières fécales diluées, qui servira à l'ensemencement du premier tube. Sans être rechargée la pipette est portée dans un deuxième tube, on agite doucement afin de bien répartir la semence à l'intérieur du milieu en évitant toutefois la production de bulles d'air ; puis on la reporte de la même façon dans

un troisième tube et ainsi de suite jusqu'au dixième tube.

Aussitôt après l'ensemencement, les tubes sont capuchonnés puis plongés dans l'eau froide et après solidification du milieu portés à l'étuve à 37°.

On surveille ensuite les jours suivants l'apparition des colonies. Celles qui apparaissent tôt, c'est-à-dire dans les 24 à 48 premières heures sont rarement des colonies de *Bacillus Bifidus*, elles appartiennent le plus souvent à des espèces anaérobies facultatives.

L'attention doit particulièrement se porter sur les colonies qui naissent vers le 3^e, 4^e ou 5^e jour.

On va les recueillir au moyen d'une pipette très effilée en évitant de toucher les colonies avoisinantes.

On en fait des examens microscopiques et ces colonies sont réensemencées toujours suivant la même technique, jusqu'à obtention de cultures pures qu'on identifie ensuite par les moyens habituels.

D'autres procédés ont été indiqués, nous n'en signalerons que quelques-uns.

Torrey en 1917 se sert de gélose glucosée profonde au foie et au sang (ce dernier étant incorporé au milieu au moment de l'ensemencement).

Adam en 1921 emploie la gélose profonde lactosée à 1 %, à laquelle il ajoute de l'hématine et de la craie.

Levinthal conseille la gélose au sang cuit.

Lauter en 1921 procède en deux temps :

Les matières sont d'abordensemencées en milieu de Tarozi (Bouillon nutritif et fragment d'organe, rein, foie, cerveau, rate, etc..., recueilli aseptiquement).

Au milieu de Tarozi il ajoute 0,5 % d'acide acétique, après 3 à 4 jours de culture dans ce milieu, il fait ses isoléments en gélose profonde de Veillon.

Cruishanks en 1925 se sert de bouillon glucosé ou lactosé à 1 %, neutre, additionné d'un morceau de rein de lapin. Ce milieuensemencé est laissé 6 à 8 jours à l'étuve à 37° sous couche de vaseline ; après quoi il procède à l'isolement en tubes de gélose de Veillon.

Schiaparelli en 1927 emploie la gélose profonde à l'infusion de foie, lactosée à 2 %.

Toutes ces techniques ont leurs avantages, elles ont presque toutes pour but l'enrichissement de la semence en *Bacillus Bifidus*, enrichissement illusoire, car le Bacille du côlon qui est souvent adjoinpousse beaucoup plus rapidement et par conséquent gêne considérablement la culture du *Bacillus Bifidus*.

Sur les conseils de M. Legroux, nous employons la technique de Tissier, des dilutions successives, modifiée de la façon suivante :

a) *Le milieu de culture.* — Au lieu d'employer la gélose profonde glucosée de Veillon seule, comme milieu nutritif, nous nous servons d'un mélange de gélose de Veillon et de gélatine nutritive glucosée à

raison de 2 parties de gélose de Veillon, pour une partie de gélatine nutritive.

De cette façon :

Le milieu étant plus limpide, la morphologie des colonies apparaît plus nettement, les très fines colonies sont bien visibles.

Il est plus aisé d'aller chercher les colonies isolées, le milieu n'offrant pas une résistance considérable à la pipette qui sert au prélèvement de ces colonies.

Enfin grâce à la présence de gélatine nutritive on évite une lyse rapide possible des bactéries.

Immédiatement avant d'ensemencer nos tubes ainsi préparés, nous incorporons à la gélose gélatine fondue et refroidie à 55°, 15 à 20 gouttes par tube d'extrait globulaire préparé selon la technique indiquée par M. Legroux.

Puis nous pratiquons nos ensemencements selon la même technique que Tissier.

b) *La pipette de Vignal.* — Dans les tubes de gélose-gélatine ainsi ensemencés et avant la solidification nous faisons des prélèvements au moyen de la pipette de Vignal.

Les pipettes de Vignal que nous employons au Laboratoire sont en verre blanc, cylindriques, de 4 millimètres de diamètre et longues de 20 centimètres. Elles sont stérilisées au four à flamber. Les

deux extrémités de la pipette sont étirées, par étranglement à la veilleuse d'un Bec Bunsen.

Au moment de leur emploi on brise un de ces étranglements, puis on passe rapidement la pipette à la flamme, et on la plonge ensuite dans le milieuensemencé et non encore solidifié. On aspire à l'autre extrémité de façon à remplir complètement le tube de Vignal. Pour chaque tube de gélose gélatine on fait ainsi 2 ou 3 pipettes de Vignal.

Lorsque le milieu fait prise dans la pipette, on scelle à la veilleuse du Bec Bunsen chacune des deux extrémités en recueillant les projections qui pourraient se produire dans un petit cornet de papier.

Les tubes de Vignal numérotés, sont alors refroidis comme les tubes de gélose gélatine en les plongeant dans l'eau froide, puis mis avec ceux-ci à l'étuve à 37° après solidification du milieu.

L'emploi de la pipette de Vignal permet la conservation intacte de 1 ou de 2 tubes de culture dans lesquels on pourra suivre ultérieurement l'évolution de la culture du *Bacillus Bifidus*.

D'autre part, le prélèvement des colonies isolées à l'intérieur de ces pipettes est beaucoup plus simple que dans les tubes de gélose de Veillon :

Une colonie étant soigneusement repérée, on fait à la lime, un peu au-dessus du niveau de cette colonie, un trait circulaire et avec l'extrémité d'une pipette portée au rouge on appuie sur le trait de lime. Le tube se brise à ce niveau très facilement et les

deux parties ainsi séparées sont déposées dans une boîte de Pétri stérile.

Le prélèvement de la colonie repérée est alors bien simple. Ces colonies prélevées sont examinées et repiquées jusqu'à l'obtention de cultures pures.

Néanmoins l'isolement du *Bacillus Bifidus* en partant des selles du Nourrisson bien portant, au sein, n'est pas toujours chose facile, la principale difficulté venant de l'extrême lenteur du développement de ce germe in vitro.

Quand il se trouve associé à d'autres germes, comme le Bacille du côlon, même en petit nombre, ceux-ci vont pulluler très rapidement dans les tubes de culture qu'ils envahissent en entier.

Si en outre ils donnent des gaz, ceux-ci disloquent le milieu.

Dans ces conditions les colonies de *Bacillus Bifidus* sont souvent très difficilement distinguées.

C'est pourquoi il est toujours bon de faire de nombreuses dilutions.

Caractères de culture du bacillus Bifidus

Bouillon nutritif. — En anaérobiose, le bacillus bifidus cultive facilement en bouillon glucosé ou lactosé. Après 3 jours d'étuve à 37°, le milieu est légèrement trouble avec dépôt floconneux dans le fond du tube, dépôt facilement dissociable par agitation.

Les divers procédés habituellement employés pour la culture des bactéries anaérobies en milieu liquide, donnent tous de bons résultats avec le *Bacillus bifidus*, mais en raison de sa simplicité et de la facilité des prélèvements, nous préférons employer la technique préconisée par Yvan Hall en 1915 et modifiée par Kadish en 1923.

Des tubes à essai ordinaires sont étranglés à leur partie moyenne — étranglement de 10 millimètres de diamètre sur 2 centimètres 5 de hauteur environ. Le bouillon nutritif est réparti dans ces tubes ainsi étranglés jusqu'à 2 centim. au-dessus de l'épaulement supérieur de l'étranglement, qui est ensuite obturé au moyen d'une bille de verre sphérique de 11 à 12 millimètres de diamètre légèrement supérieur à celui de l'étranglement. Le tube initial d'Yvan Hall était obturé par une bille de marbre. Les tubes sont ensuite bouchés au coton et stérilisés à l'autoclave à 115°.

L'autoclavage réduit les milieux. Le milieu reste réduit pendant un temps très long ce qui peut-être mis en évidence par l'adjonction de bleu de méthylène comme indicateur de réduction.

Le bleu de méthylène, en milieu oxydé, garde sa coloration bleu verdâtre qu'il perd en milieu réduit, mais comme presque toutes les matières colorantes artificielles, il fixe énergiquement l'hydrogène et n'existe plus dans les milieux qu'à l'état de leuco-dérivé.

Dans un tube d'Yvan Hall, qui vient de sortir de l'autoclave et dans lequel on avait préalablement

ajouté au bouillon nutritif deux ou trois gouttes d'une solution de bleu de méthylène à 1 pour 100, en ayant soin de bien répartir le colorant dans tout le milieu, de façon à ce que celui-ci prenne une teinte uniformément bleue, on constate qu'il s'est opéré une réduction complète. Tant dans la zone sus-jacente que dans la zone sous-jacente à la bille, le milieu est devenu absolument incolore. Mais assez rapidement le liquide au-dessus de la bille reprend la couleur bleu-verdâtre, tandis que la partie inférieure du tube demeure indéfiniment incolore.

Cette épreuve au bleu de méthylène comme indicateur de la réduction d'un milieu, montre les avantages de la technique d'Yvan Hall sur les autres procédés de cultures anaérobies en milieux liquides :

On peut priver les milieux liquides d'oxygène libre par le procédé du vide ou par l'adjonction d'un corps réducteur, ou encore en les recouvrant d'une couche de paraffine. Dans tous ces cas la coloration du bleu de méthylène est assez rapide ; elle se fait plus lentement lorsqu'on a employé un cylindre de vaseline pure qui assure une meilleure obturation du milieu. Elle n'a jamais lieu dans la partie sous-jacente à l'étranglement du tube d'Yvan Hall.

Celui ci réalise donc un excellent procédé pour la culture des bactéries anaérobies en milieux liquides.

Avec le *Bacillus bifidus*, on obtient ainsi dans la région inférieure du tube, là où l'anaérobiose est réalisée, une culture plus rapide et plus abondante.

Après 24 heures le milieu est légèrement trouble et après 48 heures il y a un dépôt assez abondant dans le fond du tube: le milieu ne redevenant jamais limpide.

Avant de pratiquer lesensemencements dans les tubes d'Yvan Hall nous incorporons toujours au bouillon nutritif 12 à 15 gouttes de solution stérile de glucose à 30% et 8 à 10 gouttes d'extrait globulaire.

Lorsque le bouillon glucosé est préparé depuis quelque temps, il est bon de régénérer les milieux avant de les employer. Pour cela les tubes sont portés au bain-marie et quand la température du milieu atteint 80 à 90° — température réalisée quand l'eau du bain-marie bout depuis 5 à 10 minutes — on libère l'oxygène dissous en frappant le tube légèrement; de fines bulles de gaz partent du fond du tube et viennent se collecter sous la bille.

Le milieu est régénéré quand l'agitation ne provoque plus la formation de gaz.

Cette régénération effectuée, l'extrait globulaire est ajouté comme précédemment.

Lesensemencements ou les prélèvements dans les tubes d'Yvan Hall se font à la pipette Pasteur: le tube est légèrement incliné, la pipette stérile ou chargée de semence va déplacer la bille obturatrice et peut alors pénétrer facilement dans le fond du tube soit pour ensemenecer le milieu soit pour y prélever une partie de la culture à étudier.

Avant d'ensemencer un tube d'Yvan Hall, il est

toujours bon de s'assurer que la bille obturatrice n'est pas coincée dans l'étranglement : quelques légères secousses imprimées au tube contre le dos de la main doivent la déplacer facilement.

Gélose de Veillon ou gélose gélatine. — En gélose glucosée profonde de Veillon ou en gélose gélatine préparée comme nous l'avons indiqué précédemment, les colonies isolées du *Bacillus Bifidus* ont en général une forme lenticulaire ou ovoïde, à bords nets, de coloration blanchâtre. D'une des faces de la lentille partent fréquemment un ou plusieurs prolongements. Parfois la colonie affecte une forme plan convexe.

Le diamètre maximum de ces colonies peut atteindre 4 millimètres, mais en général il ne dépasse pas deux millimètres.

Les zones. — La répartition des colonies dans les tubes de culture offre certaines particularités intéressantes.

Voici comment M. Tissier décrivait la culture du *Bacillus Bifidus* en gélose profonde :

« Dans la gélose glucosée profonde, trois jours après l'ensemencement on voit apparaître de fines colonies régulières, ovoïdes, de coloration blanchâtre, et s'arrêtant très nettement à trois centimètres de la surface en formant un anneau.

« Cet anneau, vu au microscope, se montre formé de petites colonies égales entre elles, mais qui cinq

jours après l'ensemencement commencent à se différencier. Les unes grossissent, deviennent lenticulaires, les autres restent petites, ovoïdes. Dans le reste du tube ces colonies se développent d'autant mieux qu'elles sont bien séparées. Mais leur croissance est comme à l'anneau irrégulière, certaines grossissent plus que d'autres.

De nombreux examens et réensemencements nous ont donné la preuve qu'il s'agissait d'une seule et même espèce ».

Pour les auteurs classiques la répartition des colonies dans les milieux du type gélose profonde de Veillon, varie suivant les espèces ensemencées : les bactéries aérobies strictes ne poussent qu'à la surface du milieu ; les bactéries anaérobies strictes ne cultivent que dans une zone qui, partant de la profondeur du tube s'arrête à deux centimètres de la surface ; enfin les bactéries aéro-anaérobies facultatives cultiveraient sur toute la hauteur du milieu.

M. Legroux depuis plusieurs années dans son cours à l'Institut Pasteur insiste sur les formations de zones de colonies de toutes les bactéries dans les tubes de gélose Veillon et surtout dans le mélange qu'il préconise de gélose gélatine.

La partie superficielle du milieu jusqu'à un centimètre de la surface est pour lui la zone aérobie mais aussi la partie la plus profonde du milieu tandis que la zone *d'anaérobiose vraie* se trouve sur une hauteur de 1 à 2 centimètres au-dessous du centimètre aérobie de surface.

L'étude de bacillus bifidus illustre parfaitement cette notion des zones d'aéro et d'anaérobiose de M. Legroux.

Quand on pratique des isolements en gélose gélatine avec des dilutions différentes de Bacillus Bifidus en employant la technique que nous avons indiquée et en ayant bien soin de répartir la semence uniformément sur toute la hauteur du milieu, on peut constater les faits suivants, après 45 heures d'étuve à 37° :

Dans les premiers tubes, où la culture est très abondante, on voit de nombreuses colonies réparties dans la totalité du milieu, sauf dans une zone supérieure distante de 1 centimètre environ de la surface. Comme l'avait vu Tissier, dans la partie supérieure de la culture, les colonies sont beaucoup plus nombreuses que dans le reste du milieu, et sont beaucoup plus serrées les unes contre les autres.

Dans les tubes suivants, on voit des colonies isolées dans le fond des tubes, colonies pouvant être de diamètres différents, mais toujours moins nombreuses que celles qui se trouvent dans un disque de 0 cm.5 à 1 cm. de hauteur et situé à 1 cm environ au dessous de la surface.

Dans les tubesensemencés avec des dilutions de plus en plus grandes de semence, ce disque devient de plus en plus net ; les colonies y sont plus abondantes et plus grosses.

Si l'on a eu soin de suivre attentivement l'évolution de la culture on s'est aperçu en outre que

c'est dans cette zone que les colonies sont apparues les premières.

Très fréquemment, les faits constatés sont plus curieux encore et dans ce disque où la culture paraît être plus abondante que partout ailleurs, on voit un second disque, de hauteur variable, mais en général sensiblement égal au précédent, où aucune colonie n'est visible. Puis vient enfin la zone inférieure des colonies nettement isolées.

Dans les pipettes de Vignal les choses se passent de façon à peu près analogue : après 48 heures d'étuve à 37°, on constate à chaque extrémité de la pipette l'existence d'une bulle d'air. A partir de cette bulle d'air on observe en allant vers le centre de la pipette : tout d'abord une zone où aucune colonie n'est visible et à laquelle fait suite un disque où les colonies sont beaucoup plus abondantes que dans la partie médiane de la pipette qui renferme des colonies bien isolées :

Dans certains cas outre les deux bulles d'air il peut exister une bulle d'air centrale ; dans ces conditions, en dehors des deux zones électives que nous venons de signaler il existe deux autres zones semblables à la partie médiane de la pipette, symétriques par rapport à la bulle d'air centrale et séparées de celle-ci par une zone dans laquelle aucune colonie n'est visible.

L'examen des tubes de culture d'une bactérie aéro-anaérobie facultative montre des choses un peu différentes.

Dans les premiers tubes de l'isolement les colonies se sont développées sur toute la hauteur du milieu, depuis la surface jusque dans la profondeur. Dans les tubes suivants la répartition des colonies change et l'on peut noter l'existence de trois zones différentes :

Une zone supérieure allant de la surface jusqu'à un centimètre environ au-dessous, où l'on constate de nombreuses colonies.

Puis une deuxième zone sous-jacente à la précédente, cylindre de $1/2$ à 1 cm. de hauteur dans lequel aucune colonie n'est visible.

Enfin une zone inférieure s'étendant jusque dans le fond du tube où sont les colonies très denses.

Avec les bactéries productrices de gaz, il faut souvent de grandes dilutions de semence pour mettre ce phénomène en évidence.

Si maintenant nous comparons des tubes de gélose profonde de même calibre et dans lesquels le milieu a été réparti sur une égale hauteur,ensemencés soit avec des bactéries anaérobies strictes, soit avec des bactéries anaérobies facultatives, on voit que dans la plupart des cas la zone où la bactérie anaérobie stricte présente son maximum de développement se trouve située dans le même plan horizontal que la « zone stérile » de la culture de la bactérie anaérobie facultative.

Le pouvoir protéolytique du *Bacillus Bifidus* est très faible.

Il ne liquéfie pas la gélatine.

En eau peptonée, en tube d'Yvan Hall culture très faible, pas de production d'indol.

Il pousse bien dans le lait sans coaguler le milieu, toutefois certaines souches le coagulent mais lentement. Dans ce cas la coagulation débute au 3^e ou 5^e jour avec rétraction légère du caillot.

Il n'attaque ni le sérum sanguin coagulé, ni l'ovalbumine coagulée.

Sur les hydrates de carbone son action est différente selon les souches examinées.

Classiquement il attaque : glucose, lactose et saccharose. Inconstamment il peut attaquer le lévulose, la mannite, le galactose, quelquefois la dextrine.

Il ne donne jamais de gaz.

Dans les tubes de gélose Veillon gélatine avec extrait globulaire, la vitalité du *Bacillus Bifidus* est assez grande.

Après trois jours d'incubation à l'étuve à 37° on peut ensuite le conserver à la température du laboratoire pendant plus de deux mois.

Il semble assez sensible à l'action de la chaleur car il est tué après une demi-heure à 55° ou 5 minutes à 70°.

CHAPITRE II

Modifications des aspects microscopiques des selles

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier d'une part, la place qui revient au *Bacillus Bifidus* dans la flore intestinale des nouveau-nés suivant le mode d'allaitement institué ; d'autre part les modifications que subit cette flore au cours des affections intestinales.

L'étude des variations de cette flore a été magistralement faite en 1900 par M. Tissier. Depuis lors de nombreux travaux n'ont fait que confirmer ses conclusions.

I. — Flore intestinale du Nourrisson bien portant suivant le mode d'allaitement.

A) CHEZ L'ENFANT AU SEIN, bien portant, la flore intestinale correspond à un type bien défini. Le *Bacillus Bifidus* en constitue l'élément prédominant, et il le restera durant toute la durée de

l'allaitement maternel, tant que celui-ci s'effectuera dans des conditions normales.

Toutefois ce n'est qu'après certaines modifications qui se produisent durant les premiers jours de la vie que la flore aboutit à ce type constant qui correspond à la « Selle de lait ».

Tissier distingue durant cette période qui précède l'établissement de la flore définitive, trois phases successives :

- une phase aseptique,
- une phase d'infection croissante durant laquelle les espèces microbiennes sont extrêmement nombreuses et variées,
- une phase de transformation de la flore qui aboutit vers le 4^e jour au type définitif.

La phase aseptique dure en moyenne 10 à 20 heures. Les bactéries apparaîtraient plus précocement en été, plus tardivement en hiver.

Cette phase se termine par une débâcle de cellules épithéliales provenant de la partie supérieure du tube intestinal.

La phase d'infection croissante est caractérisée essentiellement par l'apparition des bactéries de la putréfaction.

Avant la 24^e heure, c'est-à-dire avant toute alimentation on ne voit sur les frottis de selles que de petits cocci disposés plus ou moins régulièrement et gardant la coloration de Gram.

L'allaitement institué, la flore se modifie considérablement : les cocci se multiplient de plus en plus ; les uns en amas irréguliers, les autres en chaînettes. Il existe parfois des cocci beaucoup plus volumineux ayant l'aspect de sarcines.

Les formes bacillaires font alors leur apparition et leur nombre va rapidement en augmentant.

Lesensemencements de selles pratiqués à ce moment permettent d'isoler outre des cocci gardant la coloration de Gram : entérocoques, streptocoques, staphylocoques, le bacille paratyphique, le bacille mesentericus, le bacille tertius Gros.

Phase de transformation de la flore. — La phase d'infection croissante semble atteindre son apogée vers le 3^e jour. A partir de ce moment on assiste à une diminution progressive du nombre des espèces bactériennes. Les formes bacillaires disparaissent les premières ; les cocci persistent un peu plus longtemps. C'est à ce moment, vers le 4^e jour environ, qu'apparaissent et que vont bientôt se multiplier rapidement, aux dépens des autres bactéries, des bâtonnets à extrémités effilées, gardant la coloration de Gram et ayant tous les caractères du bacille bifidus.

Cette espèce devient alors l'élément prédominant de la flore intestinale, puisqu'elle en constitue les 9/10 environ ; le reste étant fourni par quelques bacilles du côlon et quelques rares cocci.

Les examens microscopiques montrent que le

bacillus bifidus se présente dans les selles normales, sous la forme de bâtonnets petits, minces, gardant la coloration de Gram, longs de 2 à 3 μ en moyenne et larges de 2/10 à 4/10 de μ .

Ces bâtonnets peuvent être, soit isolés, soit placés bout à bout, soit enchevêtrés les uns dans les autres en nombre plus ou moins grand, ou enfin disposés parallèlement côte à côte.

Des formes bifurquées en γ peuvent également exister.

Ces bâtonnets gardent en général assez bien les colorations. Toutefois dans certains cas, ils peuvent n'être pas teintés de façon uniforme, le colorant ne se fixant qu'à la partie centrale, épaisse du bacille, les extrémités périphériques effilées étant peu colorées.

Cet aspect microscopique est à peu près constant chez l'enfant au sein. Cependant, comme le fait remarquer Tissier : « Cette constatation est rigoureusement liée au mode d'alimentation. Le moindre écart de régime, la moindre faute contre l'hygiène alimentaire pourra se répercuter sur la flore et quelquefois même devenir apparent à l'examen bactériologique alors qu'un examen rigoureux du poids et de l'habitus extérieur de l'enfant, ne pourra les révéler ».

B) CHEZ L'ENFANT SOUMIS A L'ALLAITEMENT ARTIFICIEL, l'examen microscopique des selles est tout à fait différent.

Durant les 24 premières heures de la vie, avant l'alimentation, tout se passe comme précédemment, mais dès que l'enfant est mis au biberon, et quelque soit le lait employé, on note des changements très importants qui se caractérisent surtout par une plus grande activité de la phase d'infection croissante.

L'établissement de la flore normale est retardé, et une fois le type définitif installé, il n'y a pas d'espèce prédominante le *Bacillus Bifidus* ne formant que 30 % de la flore définitive.

Cette flore sera d'ailleurs très facilement modifiée par tout changement dans le mode d'alimentation de l'enfant.

Donc chez l'enfant au biberon « il ne se produit pas de substitution d'une flore à une autre, aucune espèce ne prend la première place et ne pullule à l'exclusion des autres » (Tissier).

En outre les examens microscopiques montrent souvent des aspects morphologiques différents de ceux que nous avons signalé chez l'enfant au sein. Nous reviendrons sur ces différences en étudiant la flore au cours des infections intestinales.

C) CHEZ L'ENFANT MIS A L'ALLAITEMENT MIXTE, il semble que le *Bacillus Bifidus* soit encore l'élément prédominant de la flore ; mais les bactéries de la putréfaction intestinale sont toutefois ici plus nombreuses que chez l'enfant au sein.

D'après Tissier l'aspect microscopique des selles

d'un enfant soumis à l'allaitement mixte diffère selon le moment où ce mode d'allaitement a été institué : quand l'enfant y est mis dès la naissance, l'aspect rappelle celui de l'enfant au biberon, tandis qu'il se rapproche de celui de l'enfant au sein si l'allaitement mixte n'a été institué que tardivement.

II. — Modifications de la flore au cours des troubles intestinaux.

Chez le jeune enfant les troubles du transit intestinal, la diarrhée en particulier, amènent des modifications importantes de l'aspect microscopique des selles.

Ces modifications qui ne s'installent que progressivement sont plus facilement mises en évidence chez l'enfant au sein. que chez l'enfant au biberon, puisqu'elles vont porter surtout sur l'espèce prédominante en en modifiant les aspects morphologiques et le nombre par rapport aux autres espèces.

C'est donc chez l'enfant au sein que nous allons particulièrement les étudier.

L'importance de ces modifications est souvent en rapport avec la gravité de l'affection qui les a déterminées.

Le fait capital est d'une part la diminution progressive du nombre de bacilles bifidus qui se présente en outre sous des aspects morphologiques anormaux ; diminution pouvant même aller jusqu'à la disparition complète de cette espèce dans le cas

d'une particulière gravité comme les états cholériques primitifs ou secondaires ; d'autre part l'apparition plus ou moins rapide de nombreuses espèces étrangères à la flore normale.

Les aspects morphologiques du bacillus bifidus sont alors des plus curieux : les bâtonnets tendent à s'allonger et leurs extrémités s'arrondissent au lieu de demeurer effilées. De rectilignes qu'ils étaient certains vont s'incurver et donneront des aspects en massue ; les formes bifurquées sont de plus en plus fréquentes et les bifurcations de plus en plus nombreuses. Des formes vésiculeuses apparaissent.

Les réactions vis-à-vis des matières colorantes sont elles-mêmes modifiées. Alors que dans les selles normales, les bâtonnets prenaient en général assez bien les colorations, dans les selles pathologiques il en est tout autrement ; certains ne sont colorés qu'à une de leurs extrémités ; d'autres ne le sont plus du tout, ou ne sont que très légèrement teints.

Tous ces aspects peuvent déjà se rencontrer chez l'enfant au biberon, mais pas avec une telle netteté.

Il est maintenant classique de rattacher toutes ces modifications de la morphologie à des formes de « souffrance » d' « involution » de la bactérie.

Des modifications en tous points semblables peuvent d'ailleurs s'observer dans les cultures *in vitro* et correspondent aux différents stades de la lyse bactérienne.

Ces modifications de l'aspect microscopique des selles vont persister tant que durera le trouble intestinal, mais celui-ci s'améliorant on va assister à un retour progressif à la flore normale. Les espèces étrangères vont disparaître, tandis que les bâtonnets gardant la coloration de Gram vont se multiplier assez rapidement et reprendre petit à petit leur aspect normal.

Toutes ces modifications de la flore sont très facilement constatées par l'examen du frottis après coloration par la méthode de Gram-Fuchsine. Ce procédé donne des résultats plus pratiques que les cultures pour le pourcentage bactérien.

Les cultures seraient beaucoup trop longues et la mise en évidence du bacillus bifidus trop difficile dans ces cas où de nombreuses espèces coexistent avec lui et ont même tendance à prédominer.

Donc au point de vue bactériologique le fait important au cours de ces états pathologiques est, d'une part, la diminution de l'espèce prédominante et habituelle de la flore, en faveur d'espèces nouvelles, et d'autre part sa réapparition progressive avec le retour à l'état de bonne santé.

Chez l'enfant soumis à l'allaitement artificiel, les infections intestinales ont en général un retentissement plus grand sur l'état de santé, que chez l'enfant nourri au sein.

Mais du fait qu'à l'état normal les selles offrent déjà un aspect microscopique des plus complexes, on conçoit toutes les difficultés qu'il peut y avoir,

même à l'examen des frottis, à mettre en évidence les modifications qui surviennent au cours des troubles intestinaux, sauf bien entendu les cas où une espèce semble prendre le pas sur toutes les autres.

Mais sous l'influence de la thérapeutique et en particulier d'un régime approprié à l'état pathologique, la flore intestinale si complexe peut subir certaines modifications. Celles de ces modifications qui nous paraissent les plus intéressantes sont celles qui ont trait à la présence du bacillus bifidus dans les frottis en plus ou moins grande abondance.

D'après de nombreuses observations inédites faites par Mme le D^r Tual-Jéramec, dans le service de M. le D^r Guillemot à l'hôpital Bretonneau, on peut dire que :

Les frottis de selles pratiqués au cours des états diarrhéiques montrent en général l'existence d'une flore très variée, et il est parfois très difficile de déceler quelques rares Bifidus, masqués au milieu de nombreuses autres espèces. Bien souvent d'ailleurs, il est complètement absent.

Sous l'influence du traitement : thérapeutique générale d'une part, régime (laits fermentés, ba-beurre, lait sec, farines lactées, etc.), d'autre part diverses éventualités peuvent se produire :

Dans la plupart des cas où l'évolution fut favorable, les examens microscopiques des selles, pratiqués tous les jours, ont fréquemment montré des modifications importantes de la flore, caractérisées

surtout par la réapparition plus ou moins rapide et en plus ou moins grande quantité du bacillus Bifidus. Cette espèce n'est toutefois redevenue prédominante que dans quelques cas seulement, mais il faut dire que ces enfants étaient soumis à l'allaitement artificiel.

Mais le fait important dans ces observations, est qu'alors que le Bifidus était absent, ou tout au moins très rare au début de la maladie, sa réapparition et sa multiplication ont assez souvent coïncidé avec un retour à l'état de bonne santé en tous cas avec un relèvement de la courbe pondérale de l'enfant.

Par contre, dans les cas où l'évolution fut fatale, il avait complètement disparu. On ne put le mettre en évidence au cours d'états graves que très rarement.

Ceci nous amène à signaler l'importance des renseignements que l'on peut tirer de l'examen microscopique des selles du nouveau-né et en particulier de la constatation en plus ou moins grande quantité du Bacillus Bifidus.

En général cette bactérie se trouve en grande abondance dans les selles d'enfants bien portants ; par contre elle tend à diminuer ou à disparaître au cours d'états pathologiques intestinaux, diminution ou disparition en rapport avec la gravité de la maladie.

Au cours des affections intestinales sa réapparition coïncide en général avec un retour prochain à l'état normal.

Et comme il y a 30 ans l'avait déjà écrit Tissier on peut dire que la présence en assez grande quantité de *Bacillus Bifidus* dans les selles des nourrissons est un test de bonne santé.

CHAPITRE III

L'antagonisme entre le *Bacillus Bifidus* et les autres bactéries intestinales

Nous avons vu que le *Bacillus Bifidus* constituait l'élément prédominant de la flore intestinale du nourrisson bien portant, élevé au sein.

Au cours des troubles intestinaux, il disparaît momentanément pour laisser la place à des espèces nouvelles et variées, et il ne reprend sa place prépondérante qu'avec le retour à l'état de bonne santé.

Il semble donc exister une sorte d'antagonisme entre le *Bacillus Bifidus* d'une part et les autres bactéries intestinales d'autre part, et là où prolifère le *Bifidus* les autres espèces ont peine à se développer; le *Bacillus Bifidus* exerçant une sorte de pouvoir empêchant vis-à-vis des autres bactéries. C'est cet antagonisme que nous nous proposons d'étudier dans ce chapitre.

Dans un chapitre de sa thèse, Tissier dit avoir été frappé au cours de ses isollements par certaines particularités curieuses.

Quand le *Bacillus Bifidus* vit en symbiose avec une autre espèce comme le streptocoque, décoloré par la méthode de Gram, ses colonies sont plus grosses, bosselées, composées uniquement de formes naines et extrêmement bifurquées. S'il réensemence une de ces colonies mixtes, seul le *Bifidus* pousse, l'espèce qui lui était adjointe ne cultive plus.

Quand le *Bacillus Bifidus* vit en symbiose avec le cocco-bacille perfœtens, il empêche cette dernière espèce si gazogène de produire des gaz.

Les mêmes phénomènes s'observent avec le *Bactérium Coli*.

Tissier a recherché si le pouvoir empêchant du *Bacillus Bifidus* était dû à des produits sécrétés par la bactérie. Pour cela il cultive celle-ci en bouillon anaérobie, puis après avoir alcalinisé le milieu, il y ajoute du bouillon ordinaire stérile en quantité égale, et il constate qu'ensemencés dans de tels milieux, non privés d'oxygène (pour empêcher le développement du *Bacillus Bifidus*) le *Bacterium Coli*, l'entérocoque y pullulent très bien.

Pour Tissier le *Bifidus* n'agirait que par une sorte de concurrence vitale en absorbant toutes les substances nutritives du milieu.

Moro et Murath constatent que les excréments de l'enfant au sein, aussi bien que ceux de l'enfant au biberon exercent une action bactéricide sur un grand nombre de micro-organismes et pour les auteurs les substances empêchantes ont la valeur des sauvegardes naturelles.

Ils supposent que le *Bacillus Bifidus* est actif lors de la formation de ces substances, mais ils ne peuvent appuyer leur hypothèse par l'expérimentation.

Kling dans un mémoire paru en 1914 dans les *Annales de l'Institut Pasteur* étudie le pouvoir empêchant du *Bacillus Bifidus* sur d'autres bactéries en particulier le bacille du côlon, le bacille protéé, le staphylocoque. Il constate qu'une culture de *Bacillus Bifidus* en développement agit sur le *Bacterium Coli* et sur les espèces voisines comme « une substance bactéricide énergique » ; que cette substance est dissoute dans le liquide de culture et qu'elle peut traverser les filtres.

Nous avons cherché à voir comment se comportaient certaines bactéries intestinales comme le Bacille du côlon, le Bacille de Shiga ensemencés dans des filtrats de cultures en milieux liquides du *Bacillus Bifidus*.

Une souche de *Bifidus* de la collection de l'Institut Pasteur est ensemencée en bouillon glucosé à 1,5 % réparti en tubes d'Yvan Hall, après 3 à 4 jours d'étuve à 37°, temps nécessaire, comme nous l'avons vu, à la culture de cette bactérie, et après vérification de leur pureté, les cultures obtenues sont filtrées sur bougie Chamberland L3. Le liquide filtré est alors réparti dans des tubes à essais stériles à raison de 8 à 10 centimètres cubes de filtrat par tube. Avant de donner le détail des expériences, nous allons indiquer rapidement la technique de filtration que nous avons employée.

Technique de filtration

La filtration a été faite de l'extérieur vers l'intérieur, l'aspiration se faisant au moyen de la trompe à eau et sous une dépression de 30 à 40 centimètres de mercure.

L'appareil à filtration complètement monté se compose

1° Du filtre,

2° Du récipient destiné à recevoir le liquide filtré ; en l'espèce une bouteille flacon de 200 centimètres cubes environ ;

3° Des caoutchoucs qui servent à relier le filtre au flacon ;

4° De la tubulure de bronze à deux voies (appareil de R. Legroux).

a) *Le filtre* — C'est une bougie en porcelaine, système Chamberland L3 de 15 centimètres de hauteur et de 10 millimètres de diamètre intérieur.

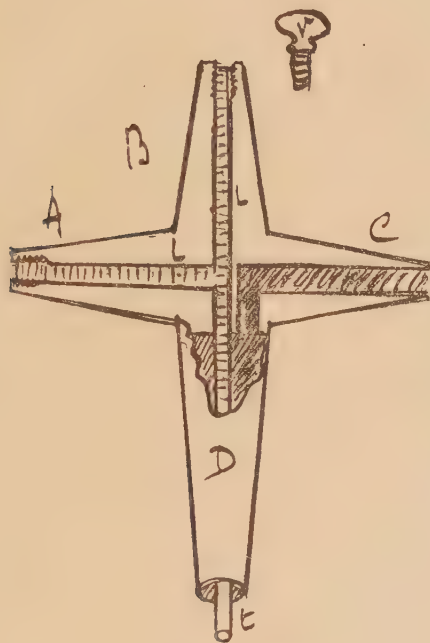
Avec cette bougie on peut filtrer des quantités de liquide variant entre 100 et 150 centimètres cubes.

Avant d'employer ces bougies, neuves ou régénérées, il est toujours bon de s'assurer qu'il ne s'est point produit de fissures dans la porcelaine. Pour cela, on les immerge dans de l'eau et on insuffle à l'intérieur de l'air au moyen d'une poire insuffla-

trice de Richardson. La moindre fente laisse passer l'air qui sort en bulles.

De telles bougies sont à rejeter.

La lumière de la bougie doit être parfaitement cylindrique. Lorsque les bougies sont défectueuses



Pl. I. — La tubulure de bronze à deux voies.

à ce point de vue on fore au moyen d'une mèche métallique de 8 millimètres de diamètre l'intérieur de cette bougie et on régularise doucement la cavité centrale.

Dans l'intérieur de cette bougie, on place un tube à thermomètre qui plonge jusqu'au fond et

de passe de 1 à 2 centimètres l'extrémité ouverte de cette bougie.

b) *La tubulure à deux voies* est constituée par une croix de bronze présentant trois tétines A, B, C, et un corps conique D traverse librement par une petite tige t. Le corps D est gainé d'un anneau de caoutchouc qui obture l'orifice du flacon destiné à recevoir le liquide filtré. La tétine B est bourrée de coton cardé. Sur la tétine C on adapte un tuyau de caoutchouc de 12 millimètres de diamètre et de 2 millimètres d'épaisseur qui relie cette tétine au tube à thermomètre de la bougie. La tétine A est reliée à une pipette à extrémité effilée destinée à la répartition du liquide filtré.

La tétine C permet de mettre en communication l'appareil à vide avec la croix de bronze.

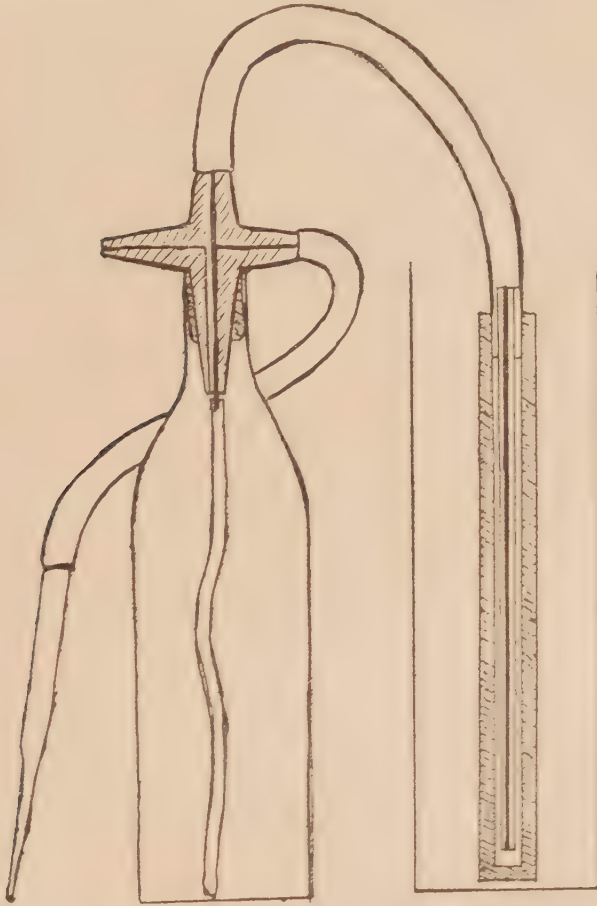
A la branche verticale inférieure du corps on adapte un tuyau de caoutchouc qui plonge jusqu'au fond de la canette. A la trompe à eau est toujours adjoint un appareil automatique de sécurité afin d'éviter les retours d'eau.

L'appareil monté est stérilisé à l'autoclave à 115°, la bougie est immergée dans le liquide à filtrer.

La filtration (pl. 2).

Par la tétine C mise en relation avec l'appareil à vide, l'air contenu dans le flacon est aspiré à travers le corps D et le petit canal creusé à la base de

la tétine C. Le vide se fait dans le flacon et dans la bougie par l'intermédiaire des canaux L creusés à l'intérieur du corps et des tétines A et B.



Pl. 2. — Appareil à filtration.

Le liquide qui enveloppe la bougie passe à travers les pores de celle-ci, remplit sa cavité centrale et arrive dans le flacon par l'intermédiaire du canal L de la tétine A et de la tige *l*.

La filtration terminée on place une pince sur le caoutchouc monté sur la tétine B. Ce caoutchouc est alors retiré et l'orifice de la tétine flambé est bouché aseptiquement avec le bouton à vis.

Il ne reste plus qu'à répartir le liquide filtré au moyen de l'effilure répartitrice.

Pour effectuer les filtrations dans de bonnes conditions certaines précautions sont à prendre ;

a) Avant de stériliser les appareils à filtration, introduire une petite quantité d'eau dans l'effilure de la pipette répartitrice ;

b) Avant de commencer la filtration paraffiner la jointure : tuyau à vide-bougie filtrante ;

c) Mouiller la bougie.

La filtration doit être lente, mais ne doit jamais se prolonger plus de 20 à 30 minutes.

Le développement du *Bacillus Bifidus* donnant aux milieux une réaction franchement acide — mauvaise condition de filtration — (le liquide à filtrer devant autant que possible avoir une réaction neutre), nous avons été obligé de pratiquer plusieurs filtrations successives, d'abord sur bougie L1 puis sur bougie L3.

Au cours de la filtration, il arrive parfois que l'on voit sortir des bulles d'air du tube de caoutchouc qui plonge à l'intérieur de la canette. Il s'agit dans ce cas d'une défectuosité dans le montage de l'appareil.

a) Il peut y avoir une solution de continuité sur

le parcours bougie-canette ou canette effilure réparitrice ;

b) Le tube à thermomètre placé à l'intérieur de la bougie peut ne pas plonger jusqu'au fond de celle-ci. Dans ce cas la cavité creusée à l'intérieur de la bougie n'a pas une forme parfaitement cylindrique comme il se doit, mais une forme tronc-conique défectueuse, car le liquide qui a traversé les parois de la bougie se collecte au fond de celle-ci et n'est aspiré ensuite qu'avec une certaine quantité d'air.

Les filtrats répartis en tubes stériles sont ensuite éprouvés durant 24 heures à l'étuve à 37°.

Essais de culture dans ces filtrats.

Dans ces filtrats pris comme milieux nutritifs et dont la réaction est nettement acide au papier de tournesol, nous avons essayé d'obtenir des cultures de bacille du côlon et de bacille de Shiga.

Les résultats ont d'ailleurs été identiques pour l'une comme pour l'autre de ces bactéries.

Nous ne donnerons que les résultats obtenus avec le bacille du côlon :

1° Dans du filtrat pur nous ensemençons chaque jour et à des doses progressivement croissantes du bacille du côlon (Souche H de l'Institut Pasteur).

Le premier jour une anse de platine d'une culture de 24 heures en bouillon ;

Le deuxième jour de même ;

Le troisième jour une goutte d'une même culture, au moyen d'une pipette Pasteur, titrant 25 gouttes au centimètre cube ;

Le quatrième jour deux gouttes, et ainsi de suite chaque jour en opérant parallèlement desensemencements témoins dans du bouillon nutritif ordinaire.

Les tubes sont portés à l'étuve à 37° et examinés au bout de 24 heures.

Aucune culture n'y fut jamais décelable, tandis que dans les tubes témoins les cultures étaient très abondantes.

Nous pouvons donc dire qu'un milieu dans lequel a pullulé le *Bacillus Bifidus* et débarrassé de cette culture par filtration à travers les bougies est devenu impropre à la culture du bacille du côlon.

2° On peut se demander si ce n'est pas la réaction acide de ces milieux qui gêne la culture du bacille du côlon. L'expérience montre que non :

En effet si on alcalinise ces filtrats avec une solution stérile de carbonate de soude à 10 % jusqu'au virage au bleu du papier de tournesol :

Dans de tels milieux, on peut recommencer lesensemencements comme précédemment sans jamais obtenir de culture.

Ce n'est donc pas l'acidité du milieu qui empêche la culture.

3° Dans une troisième expérience, les filtrats sont chauffés à 100° durant 10 minutes. Les ensemence-

ments sont ensuite recommencés comme dans les deux expériences précédentes et il est toujours impossible d'obtenir des cultures.

Donc un chauffage à 100° durant 10 minutes ne détruit pas le pouvoir empêchant de ces filtrats.

Nous devons toutefois dire que dans de tels filtrats les bactériesensemencées, quoique ne donnant lieu à aucune culture, ne se détruisent pas complètement, car après 24 heures de séjour dans ces milieux elles sont encore repiquables en bouillon et sur gélose ordinaire. Dans ce cas, les nouvelles cultures offrent certaines particularités sur lesquelles nous reviendrons plus loin.

Après un an de conservation en tubes scellés, le filtrat a gardé toutes ses propriétés empêchantes.

Cette substance empêchante peut être soit un produit de désintégration du *Bacillus Bifidus* dans le milieu acide ou encore être due à une véritable modification chimique de la constitution du bouillon nutritif, telle que celui-ci devient impropre à la culture du Bacille du côlon. Dans ce dernier cas cette modification est thermostable puisqu'un chauffage à 100° ne la modifie pas.

Cette substance semble toutefois s'éloigner des principes lytiques transmissibles ou non.

Comportement du bacille du côlon dans les milieux renfermant du bouillon nutritif et du filtrat.

Lorsqu'au filtrat de culture de *Bacillus Bifidus* on ajoute du bouillon nutritif neuf dans certaines proportions, il est possible d'obtenir des cultures de bacille du côlon.

Nous nous sommes demandé si cette bactérie ne se trouvait point modifiée dans ses propriétés biologiques du fait de son passage dans de tels milieux.

Pour cela nous avons préparé toute une série de milieux dans lesquels à des doses progressivement décroissantes de filtrat nous ajoutons des doses inversement proportionnelles de bouillon nutritif neuf.

Nous avons fait en outre un tube témoin : bouillon nutritif seul. Tous ces tubes furent ensemencés avec le bacille du colon H de la collection de l'Institut Pasteur.

Après un séjour de 24 heures à l'étuve à 37°, dans le tube contenant du filtrat et du bouillon neuf à parties égales et dans ceux contenant plus de bouillon que de filtrat, il existe une culture aussi abondante que dans le tube témoin ; par contre dans les tubes renfermant plus de filtrat que de bouillon la culture était moins abondante et offrait certaines particularités que nous allons étudier.

CARACTÈRES DE LA SOUCHE BACILLE DU COLON H.

Avant de décrire les propriétés biologiques du bacille du colon après son séjour en milieu au filtrat, nous allons d'abord décrire celle de la souche employée :

Le bacille du colon H est mobile et se décolore facilement par la méthode de Gram et après recoloration par la fuschine de Ziehl diluée la plupart des éléments sont uniformément colorés en rouge.

Bouillon nutritif. — Culture rapide, après 6 heures d'étuve à 37°, on observe déjà un léger trouble du milieu.

Après 24 heures le milieu est uniformément trouble et opaque, il y a un léger dépôt dans le fond du tube, dépôt facilement dissociable par agitation. Il existe en outre un anneau gras à la surface. L'agitation du milieu provoque l'apparition d'ondes moirées à l'intérieur de la culture.

Gélose nutritive. — Les colonies isolées sont surélevées, blanchâtres, à contours nettement limités. Elles sont lisses, leur surface est légèrement humide, leur centre est opaque, la périphérie légèrement bleutée.

Il ne liquifie pas la gélatine.

En gélose profonde de Veillon il pousse comme les cultures habituelles de bacilles du colon.

Il coagule le lait après 48 heures sans rétraction du caillot.

Le petit lait tournesolé se trouble légèrement et rosit en 24 heures.

En eau peptonée à 2 % on constate un léger trouble avec anneau gras à la surface et dépôt dans le fond du tube. La recherche de l'Indol après 48 heures d'étuve pratiquée selon la méthode d'Erich est nettement positive.

Action sur les hydrates de carbone. — Cette souche attaque les sucres suivants avec production de gaz :

Glycérine, mannite, galactose, levulose, glucose, arabinose, xylose, lactose et maltose.

Elle est sans action sur le saccharose.

Sur pomme de terre la culture est abondante et grasse ; après quelques jours elle prend une teinte brunâtre légèrement chocolat qui s'étend au milieu.

Il vire au jaune le rouge neutre avec fluorescence et dégagement de bulles de gaz.

Il noircit la gélose au sous-acétate de plomb.

Si nous étudions maintenant les propriétés de cette souche après passage dans un milieu renfermant du filtrat de culture du *Bacillus Bifidus* nous constatons les faits suivants :

Les propriétés vis-à-vis des substances azotées ou vis-à-vis des hydrates de carbone n'ont jamais varié.

Les modifications importantes obtenues se rap-

portent à la culture en bouillon et à la morphologie des colonies sur gélose inclinée.

Ces modifications ont été beaucoup plus nettes avec les milieux où le filtrat constituait l'élément prédominant.

Si donc nous repiquons en bouillon nutritif et sur gélose inclinée le bacille du colon qui vient de séjourner durant 24 heures dans ces milieux : bouillon-filtrat, on observe les faits suivants :

En bouillon nutritif. — Le départ de la culture se fait également vers la sixième heure, mais après 24 heures d'étuve à 37° on constate dans le fond du tube un très gros dépôt, difficilement dissociable même par agitation. Le reste du milieu est limpide et tient en suspension de nombreux petits flocons, à la surface il existe encore un anneau gras.

Sur gélose inclinée. — Si on a eu soin de pratiquer les ensemencements de façon à obtenir des colonies isolées, on constate l'existence de deux sortes de colonies différentes :

a) Les unes semblables à celles décrites précédemment ;

b) Les autres sont plates, sèches, légèrement plissées et à contours nettement irréguliers et très découpés.

Après 48 heures de séjour dans ces milieux les colonies de bacille du colon reportées sur gélose prennent un aspect plus curieux encore.

Les colonies normales ont presque toutes disparu et il ne reste que des colonies sèches.

En repiquant quotidiennement ces colonies sèches sur gélose inclinée, selon la technique des isoléments, deux éventualités peuvent se produire.

— Ou bien on voit apparaître des colonies normales qui deviennent de plus en plus nombreuses, et après un certain nombre de repiquages la souche a repris son aspect normal.

— Ou bien les colonies sont devenues plissées et dans ce cas après quelques passages sur gélose ordinaire nous avons perdu notre souche.

Cet aspect agglutiné des cultures en bouillon avec un aspect plissé des cultures sur gélose correspond à ce que M. Legroux a décrit sous le nom d'ectolyse bactérienne sèche.

Dans les cas où les colonies sèches reprenaient après quelques passages leur aspect normal nous n'en n'étions qu'au stade de prélyse du bacille du côlon. Dans les cas où l'aspect plissé a subsisté et où nous avons perdu notre souche, l'ectolyse sèche a abouti à la lyse totale.

Conclusions

1° Le procédé de choix pour l'isolement du *Bacillus Bifidus* en partant des selles de nourrisson consiste à ensemer ces selles en dilutions successives dans des tubes de gélose Veillon gélatinée.

Les pipettes de Vignal seront toujours employées, elles facilitent le prélèvement.

2° On obtient de belles cultures du *Bacillus Bifidus* en milieux liquides soit en ajoutant à ces milieux des corps réducteurs comme le sulfure de calcium ou le sulfite de sodium, soit en employant la technique préconisée par Yvan Hall.

Cette dernière méthode seule permet la culture d'une bactérie anaérobie stricte dont les éléments se développent lentement.

Avec cette technique il est en outre possible de procéder à plusieurs prélèvements sans entraver les cultures. On ne peut faire de même avec les cultures en tubes scellés.

L'adjonction de gélatine et d'extrait globulaire en bouillon réparti en tube d'Yvan Hall constitue un excellent milieu de conservation du *Bacillus Bifidus*.

3° Il existe un antagonisme marqué entre le Bacil-

lus Bifidus et quelques bactéries intestinales. Un milieu dans lequel a cultivé le *Bacillus Bifidus* est du reste impropre à la culture de certaines bactéries comme le Bacille du côlon ou le Bacille de Shiga.

Lorsqu'on parvient toutefois à cultiver certaines bactéries dans des milieux renfermant une certaine quantité de filtrat de culture de Bifidus en milieu liquide, ces bactéries sont atteintes dans leur vitalité, présentent des caractères nouveaux et ont tendance à se lyser spontanément.

4° Si le Bifidus est l'élément prépondérant de la flore normale du nourrisson au sein, il tend à disparaître au cours des infections intestinales. Dans ces cas lorsque les examens microscopiques des selles, répétés, montrent sa réapparition progressive, on peut espérer un retour prochain à l'état normal. Ce qui permet de dire comme H. Tissier que la présence du *Bacillus Bifidus* dans les selles du nourrisson est un test de bonne santé.

Vu : le Président de la thèse,
LEMIERRE.

Vu : le Doyen,
BALTHAZARD.

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

Bibliographie des auteurs cités

1. *Adam.* — Grund'agen des Emährungs physiologie des B. Bifidus (Zeitschrift fur kinderh., 1922, p. 331 et 361).
2. *Agulhon (A.) et Legroux (R.).* — Contribution à l'étude des vitamines utilisables à la culture des micro-organismes. Application au b. de l'influenza (C. R. Ac. Sciences. t. CXLVII, 21 octobre 1928, p. 597).
3. *Baginsky.* — Les fermentations dans le canal intestinal de l'enfant (Deutsche Med. Wochensch., 1888, n^{os} 20 et 21).
4. *Cortet (J.) et Tissier (H.).* — Note sur un streptocoque décoloré par la méthode de Gram (C. R. Soc. Biologie, juin 1901).
5. *Cruishanks.* — B. Bifidus ; its characters and isolation from the intestin of infants (The Journal of Hygiene, 1925, p. 24-241-254).
6. *Escherich.* — Die darmbakterien dess sanglings und ihre Beziehung zur physiologie der verdaung (Forsch. des med. 1885).
 - Beitrage zur Keuntniss der Darmbakterien (Munich Med. Wochensch., 1886, p. 43. Monographie de Stuttgart, 1886).
 - Les fermentations dans le canal intestinal de l'enfant (Deutsch. Med. Woch. 1888, n^o 24).
7. *Hall (Yvan).* — An improved fermentation tube (Ann. f. Publ. Health, N.-Y., 1914, p. 1173-1178).
 - A new aero-anaerobic tube. Univ. Calif. Publ. Health (Berkely, 1915, p. 147-155).
8. *Kadisch.* — Beitrage zur anaerobentechnik (Centralbl. fur Bakterioli, 1923-1924, p. 330-558).

9. *Kling.* — Du rôle physiologique joué par le *B. Bifidus* dans le canal intestinal (Ann. I. P., 1914, t. XXVIII, p. 797).
10. *Lauter.* — Uber das vorkommen des *B. Bifidus* beim Neugeborenen (Centralbl. fur Bakteriologie, 1921, p. 86 et p. 579).
11. *Legroux (R.).* — Cours de micrologie Institut Pasteur 1930. Filtration, technique générale des cultures anaerobies.
 - L'actolyse bactérienne (C. R. Soc. Biologie, 1932, t. CIX, p. 373).
 - L'endolyse bactérienne (C. R. Soc. Biologie, 1932, t. CIX, p. 424).
- Legroux (R.).* — Sur la nature de la lyse bactérienne (C. R. Soc. biologie, 1932, t. 109, p. 588).
12. *Legroux (R.). et Magrou (J.).* — Etat organisé des colonies bactériennes (Annales Institut Pasteur, 1920, t. 30, p. 417).
13. *Legroux (R.) et Mesnard (J.).* — Vitamines pour la culture des bactéries (C. R. Ac. Sciences, 19 avril 1930, t. 160, p. 901).
14. *Moro et Murath.* — Wien Klin. Wochens., 1906, p. 371.
15. *Schiaparelli.* — Isolement et Morphologie du *B. Bifidus* (Bull. dell Institut. Serotherap. Milanese, VIII, 39, p. 533).
16. *Schmidt.* — Sur les bactéries des fèces des nourrissons (Wien Klin. Woch., 1892, n° 45).
17. *Tissier (H.).* — Le bactérium coli et la réaction chromophile d'Escherich (C. R. Soc. biologie, 2 déc. 1899).
 - Thèse Médecine. Paris, 1900.
18. *Torrey et John (C.).* — New differential plating for *B. Bifidus* (Tissier) and *B. acidophilus* (Moro) (J. I. D., 1917, n° 2, p. 434-439).
19. *Veillon.* — Thèse Médecine. Paris, 1893.

